

16.10.03 #2

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月 7日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-230196

[ST. 10/C]: [JP2002-230196]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

REC'D 06 NOV 2003

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

BEST AVAILABLE COPY

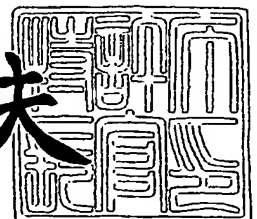
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 332-02145

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 仲山 賢一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 石井 智子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 地神 芳文

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代表者】 吉川 弘之

【電話番号】 0298-61-3280

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002- 60679

【出願日】 平成14年 3月 6日

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】

糖鎖合成遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酵母小胞体における N 結合型糖鎖合成を触媒する酵素遺伝子と相同性を有し、かつ酵母における該遺伝子の欠失株に対して該遺伝子の機能を相補し得るものであって、ヒト N 結合型糖鎖合成を触媒する酵素を合成するためのヒト遺伝子。

【請求項 2】 ヒト N 結合型糖鎖合成を触媒する酵素が糖転移酵素である請求項 1 記載のヒト遺伝子。

【請求項 3】 配列番号 2、4、6、8 または 10 で示されるアミノ酸配列、あるいはその一部アミノ酸の欠失、置換、付加を含むアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 4】 配列番号 1、3、5、7、または 9 で示される塩基配列を有する遺伝子。

【請求項 5】 請求項 3 で示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子、あるいは配列番号 1、3、5、7、または 9 で示される遺伝子を用いたヒト糖鎖不全症候群の診断あるいは治療薬。

【請求項 6】 請求項 1～3 いずれか一項に記載の遺伝子により組み換えられた組み換えベクター。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物からヒト N 結合型糖鎖の合成を触媒する酵素を採取することを特徴とする、ヒト N 結合型糖鎖の合成を触媒する酵素の製造方法。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の酵素を用いることを特徴とする、ヒト N 結合型糖鎖の合成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の所属する技術分野】

本発明は、ヒト由来のN結合型糖鎖合成に関わる酵素を合成するためのヒト遺伝子、該遺伝子を用いた糖タンパク質糖鎖不全症候群（CDGS）の診断あるいは治療薬、該遺伝子により組み換えられた組み換えベクター及び形質転換体、該形質転換体を用いてヒトN結合型糖鎖の合成を触媒する酵素を製造する方法、若しくは該酵素あるいは上記形質転換体を用いて、ヒトN結合型糖鎖を合成する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖タンパク質糖鎖不全症候群CDGSの原因遺伝子を特定するためには、糖鎖合成に関わる遺伝子を網羅的にクローニングする必要がある。特に、ヒトN結合型糖鎖の根本の合成に関わる遺伝子であるヒト小胞体での合成過程における遺伝子群は、特に重要である。

現に、糖タンパク質糖鎖不全症候群のうち、いくつかの原因遺伝子が究明されているが、これらの多くは小胞体でのN結合型糖鎖の合成に関わる遺伝子の不全によることが知られている。この小胞体でのN結合型糖鎖の合成経路は、酵母からヒトに至るまで共通して存在し、その合成に関わる遺伝子の多くは、酵母で単離されてきている。

【0003】

一方、ヒトの遺伝子については、データベース上にほぼ全ての配列があると考えられているにもかかわらず、その機能が未知であるために、そのほとんどの遺伝子が単離されていない。このため、さらなるCDGSの詳しい診断、治療のためには、これらの遺伝子の単離が重要な課題となっている。

一方、このN結合型糖鎖の合成において、基本骨格となる小胞体での生合成酵素は、生体外での大量合成を行う際には必須のものである。このことから、これらの遺伝子を単離する事は、糖鎖工学への応用として酵素の供給をする際にも非常に重要となる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、小胞体でのN結合型糖鎖合成系に関わるヒトの遺伝子を明らかにし、これを用いて、糖タンパク質糖鎖不全症候群の診断、治療を行うとともに、糖鎖工学への応用として該酵素を大量合成する手段を提供することにある。

【0005】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、酵母の小胞体でのN結合型糖鎖合成を触媒する酵素の遺伝子と相同性の高いヒト遺伝子を見だし、これをクローニングした。そして、該クローニングされた上記ヒト遺伝子は、驚くべきことに、酵母小胞体における該遺伝子の欠失株に対して該遺伝子の機能を相補し得たことにより、ヒトの小胞体のN結合型糖鎖合成酵素の遺伝子であると確信し、本発明を完成させるに至った。

【0006】

すなわち、本発明は以下のとおりのものである。

- (1) 酵母小胞体におけるN結合型糖鎖合成を触媒する酵素遺伝子と相同性を有し、かつ酵母における該遺伝子の欠失株に対して該遺伝子の機能を相補し得るものであって、ヒトN結合型糖鎖合成を触媒する酵素を合成するためのヒト遺伝子。
- (2) ヒトN結合型糖鎖合成を触媒する酵素が糖転移酵素である(1)記載のヒト遺伝子。
- (3) 配列番号2、4、6、8または10で示されるアミノ酸配列、あるいはその一部アミノ酸の欠失、置換、付加を含むアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子。
- (4) 配列番号1、3、5、7または9で示される塩基配列を有する遺伝子。
- (5) 上記(3)で示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子、あるいは配列番号1、3、5、7、または9で示される遺伝子を用いたヒト糖鎖不全症候群の診断あるいは治療薬。
- (6) 上記(1)～(3)いずれか一項に記載の遺伝子により組み換えられた組み換えベクター。

(7) 上記(6)に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

(8) 上記(7)に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物からヒトN結合型糖鎖の合成を触媒する酵素を採取することを特徴とする、該酵素の製造方法。

(9) 上記(8)に記載の酵素を用いることを特徴とする、ヒトN結合型糖鎖の合成方法。

【0007】

本発明において、ヒトN結合型糖鎖合成を触媒する酵素の遺伝子をクローニングするために用いる遺伝子は、酵母小胞体のN結合型糖鎖合成に関与する酵素群の遺伝子であり、例えば、ALG11遺伝子、ALG8遺伝子、ALG9遺伝子、ALG10遺伝子、ALG12遺伝子等に属する遺伝子である。具体的には、例えばシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) のalg11遺伝子、サッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) のALG8遺伝子、ALG9遺伝子、ALG10遺伝子、ALG12遺伝子等である。

【0008】

上記シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) のalg11遺伝子は、N結合型糖鎖合成系におけるグリコリピド α -マンノシルトランスフェラーゼ (EC2.4.1.131) をコードする遺伝子である。

サッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) のALG8遺伝子はN結合型糖鎖合成系におけるグリコリピド α -グルコシルトランスフェラーゼ (EC2.4.1.-) をコードする遺伝子である。

サッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) のALG9遺伝子はN結合型糖鎖合成系におけるグリコリピド α -マンノシルトランスフェラーゼ (EC2.4.1.130) をコードする遺伝子である。

サッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) のALG10遺伝子はN結合型糖鎖合成系におけるグリコリピド α -グルコシルトランスフェラーゼ (EC2.4.1.-) をコードする遺伝子である。

サッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) のALG12遺伝子はN結合型糖鎖合成系におけるグリコリピド α -マンノシルトランスフェラーゼ (EC2.4.1.130) をコードする遺伝子である。

【0009】

これら酵母の遺伝子と相同性を有し、かつ酵母におけるこれら遺伝子の欠失あるいは変異株に対してその機能を相補できるヒト遺伝子は、ヒト小胞体におけるN結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子といえる。

したがって、本発明においてヒト小胞体におけるN結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子を得るには、酵母小胞体におけるN結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子と相同性のあるヒト遺伝子をクローニングする。これには、例えば、酵母の上記N結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子の塩基配列を基に合成プライマーを作成し、ヒトのcDNAライブラリーを用いPCR法により、酵母小胞体におけるN結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子と相同性のあるクローニングされたヒトDNAを得ることができる。

【0010】

次いで、酵母小胞体におけるN結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子と相同性のあるヒト遺伝子を、酵母において発現可能なベクター、例えばpREP1、YEp51、YEp352 GAP、pSH19、pY0325等に連結し、該組み換え発現ベクターを用いて、N結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子が欠失あるいは変異された酵母を形質転換する。形質転換された酵母が、該酵素遺伝子の欠失または変異により喪失した機能を回復していれば、上記ヒト遺伝子はヒト小胞体におけるN結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子である。以後、PCRによる増幅、あるいは形質転換体の培養で、上記組み換えベクターを多数取り出し、該ベクターの制限酵素等による切り出し等の当該分野で周知の方法により、ヒト小胞体におけるN結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子を得ることができる。

【0011】

この点について、さらに具体的にいえば、例えば、上記シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) の *alg11* 遺伝子は、N結合型糖鎖合成系におけるグリコリピド α -マンノシルトランスフェラーゼ (EC2.4.1.131) をコードする遺伝子であり、この遺伝子に変異のあるシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) *gmd3* 株は、温度感受性であり、また糖鎖付加不全となり、糖蛋白である酸性フォスファターゼの糖鎖付加において不全があるため、

野生型に比べ小さい分子量のものを生産する。一方、*alg11*遺伝子の配列を基にプライマーを作成し、ヒト cDNA ライブラリーを用いて PCR により増幅を行い、*alg11*遺伝子と相同性の高いヒト遺伝子（例えば FLJ21803）を得る。該遺伝子を用いて、上記 *gmd3* 株を形質転換し、温度感受性および酸性フォスファターゼの分子量の大きさをみる。形質転換体が温度感受性マイナスで、酸性フォスファターゼの分子量を野生型株と同じ位置に戻していれば、上記ヒト遺伝子は、ヒト小胞体における N 結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子であり、常法により該遺伝子を大量生産できる。

【0012】

上記 N 結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子が欠失あるいは変異された酵母株には、例えば、*alg11*遺伝子が変異したシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) *gmd3* 株、*ALG8*遺伝子が変異したサッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) *alg8* 株等が挙げられるが、放射線、紫外線照射等の突然変異手段により、酵母を変異させ、糖タンパク質の分子量の減少や温度感受性などを指標として、N 結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子が欠失あるいは変異された酵母株をスクリーニングして得ることができる。

【0013】

CDGS は常染色体劣性遺伝性疾患であり、小脳形成不全や肝障害、末梢神経傷害等様々な病体を呈し、そのうち I 型は N 結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子の欠失あるいは変異より該酵素の欠損により引き起こされるとされており、本発明において初めてヒト N 結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子として同定された遺伝子は、有用な CDGS の診断薬である。例えば、本発明の配列番号 1 で示されるグリコリピド α -マンノシルトランスフェラーゼ (EC2.4.1.131) の塩基配列と、対応する患者の酵素遺伝子の塩基配列と対比して、遺伝子の異常をみることにより、CDGS か否かを診断することができる。

【0014】

本発明のヒト N 結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子を使用して診断を行う場合において、対比の対象となる患者の酵素遺伝子は、本発明の該酵素遺伝子をプローブとして患者の血液等から対象遺伝子を取り出し、これを適宜 PCR 法により増幅

することにより得ることができる。

また、本発明のヒトN結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子は、遺伝子治療においても有用であり、これには、本発明のヒトN結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子を、例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、センダイウイルス等の遺伝子治療用のベクターに組み込み、ヘルパー細胞などを用いて当該遺伝子を含むウイルス粒子を調製し、これを人体に接種することにより導入する。

【0015】

本発明においては、ヒトN結合型糖鎖合成系の酵素遺伝子を、プラスミドpBR322、pUC18、pUC19、pET-3、YEp51、YEp352GAP等のベクターに組み込み、該ベクターで細菌あるいは酵母等の宿主を形質転換し、該形質転換体を培地に培養することにより、該遺伝子に対応するヒトN結合型糖鎖合成系の酵素を大量に生産することも可能である。本発明の酵素の製造方法において用いるベクターとしては、例えば大腸菌が宿主の場合pBR322、pUC18、pET-3等があげられる。酵母が宿主の場合は、YEp13、YCp50、YEp51、YEp352GAP、pSH19、pREP1等があげられる。さらに、該遺伝子を発現させるにはその上流にプロモーターを接続する。本発明で用いられるプロモーターは、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。宿主としては大腸菌 (BL21、BL21(DE3) など)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe* など) 等が挙げられる。

【0016】

上記した製造方法により得られるヒトN結合型糖鎖合成系の酵素は、それ自体CDGSの治療薬として有用であるほか、該酵素を用いて生体外でヒトN結合型糖鎖を合成することもできる。例えば、ヒトALG11相同遺伝子にコードされる α マンノシルトランスフェラーゼの場合、基質としてMan4GlcNAc2-pp-DolとGDP-mannoseを用いることにより、Man5GlcNAc2-pp-Dolを合成できる。

【0017】

以下に、本発明の実施例を示すが、本発明は特にこれに限定されるものではない。

【実施例1】

〈ALG11 ヒトホモログFLJ21803のクローニング〉

ヒトのcDNAライブラリーを用いてPCR法により遺伝子をクローニングした。CDNAライブラリーはCLONTECH社のQUICK.Clone cDNAを用いた。プライマーは、データベース上に登録されている配列をもとに、制限酵素でタンパク質をコードしている部分が容易に切り出せるように、N-末端部分にNdeIサイト、C-末端部分にSmaIサイトをあらかじめ含んだプライマーを作製した。それぞれのプライマーの配列を以下に示す。

TCCCCCGGGTTACTTAAATAACTTTTCCACAGATGATAGGAA

GGGAATTCCATATGGCGGCCGCGAAAGGAGCTG

PCRの条件は以下のとおりである。

第1段階: 94℃ 15秒

第2段階: 49℃ 30秒

第3段階: 72℃ 3分

30サイクル

【0018】

この条件で得られた約1.5 kbpのDNA増幅断片をTAクローニングキットを用いてpCR2.1TOP0ベクターに挿入した。このクローニングされた遺伝子をダイデオキシ法を用いたシーケンスキットにより塩基配列を確認した。該遺伝子は配列番号1で示される塩基配列を有していた、なお、配列番号1には該遺伝子の塩基配列とともに対応するアミノ酸配列を示した。また、該遺伝子に対応する蛋白質のアミノ酸配列を配列番号2に示した。

〈形質転換〉

pCR2.1TOP0ベクターに挿入されているFLJ21803遺伝子をNdeI-SmaIで切り出し、分裂酵母のプロモーターnmt1とそのターミネーターの間にマルチクローニングサイトをもつ分裂酵母多コピー発現用ベクターPREP1のNdeI-SmaIサイトに挿入して、21803/pREP1を構築した。この発現ベクターを分裂酵母のシゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) gmd3変異株へ形質転換した。

【0019】

〈gmd3変異株の機能〉

得られた形質転換体について、N結合型糖鎖合成の有無の指標となる温度感受性を調べた。形質転換体及びコントロールであるシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) JY746株 (野生株) とgmd3株を以下の組成を有するMM-leu培地で37℃で3日間培養して、温度感受性を調べた。

その結果、形質転換体と野生株は37℃でも生育できることが確認された。これに対してgmd3株は37℃では生育できなかった。

一方、37℃で生育できた形質転換体を採取し、低リン酸培地で生育させた後ガラスビーズで破碎した物を試料とし、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。同様にしてサッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) のALG11遺伝子を形質転換したgmd3株から得られた試料、gmd3株試料、及び上記JY746株 (野生株) 試料についても電気泳動を行った。これらの結果を合わせて図1に示す。

【0020】

図中1～3レーンは、上記シゾサッカロミセス・ポンベ形質転換体から得られた試料についてのものであり、4レーンは別途培養して得られたgmd3株試料であり、5レーンはサッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) のALG11遺伝子を形質転換したgmd3株から得られた試料であり、6レーンはJY746株 (野生株) から得られた試料である。

形質転換体試料とJY746株 (野生株) 試料においては、ともに完全に糖鎖が付加した分子量の大きな酸性フオスファターゼに対応するバンドがみられるのに対して、gmd3株試料では該バンドより分子量の小さな不完全な糖鎖付加が起きたバンドしか見られない。

したがって、このことから、ヒト遺伝子FLJ21803は分裂酵母内でも機能を相補することが明らかとなった。

【0021】

【実施例2】

〈ALG8ヒトホモログMGC2840のクローニング〉

ヒトのcDNAライブラリーを用いてPCR法により遺伝子をクローニングした。cDNAライブラリーはCLONTECH社のQUICK-Clone cDNAを用いた。プライマーは、データ

一ベース上に登録されている配列をもとに、プライマーを作製した。それぞれのプライマーの配列を以下に示す。

GGAATTCCATATGGCGGCGCTCACAATTGCCACGGGTACTGGC

TCCCCCGGGTCATTGTTTCTTTGTCTTGCCAATAGCAGAG

PCRの条件は以下の通りである。

94℃ 30秒

50℃ 30秒

72℃ 2分

30サイクル

【0022】

この条件で得られた約1.5kbpのDNA増幅断片をTAクローニングキットを用いてpCR2.1TOP0ベクターに挿入した。このクローニングした遺伝子をダイデオキシ法を用いたシーケンスキットにより塩基配列を確認した。該当遺伝子は配列番号3で示される塩基配列を有していた。なお、該遺伝子に対応する蛋白質のアミノ酸配列を配列番号4に示した。

〈形質転換〉

pCR2.1TOP0ベクターに挿入されているMGC2840遺伝子をEcoR I-Nae Iで切り出し、酵母の解糖系のプロモーターGAPDHとそのターミネーターの間にpUC18のマルチクローニングサイトのうちEcoR IからSal Iまでの部分を持つ発現用ベクターYEplac352GAPのEcoR I-Pvu IIサイトに挿入した。これらの発現ベクターを出芽酵母のサッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) alg9変異株へ形質転換した。

【0023】

〈alg8変異株の機能回復〉

得られた形質転換体について、N結合型糖鎖合成の有無の指標となる温度感受性を調べた。形質転換体及びコントロールであるサッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) W303-1A株 (野生株) とalg8変異株を以下の組成を有するSD-ura培地で30℃で5日間培養して、温度感受性を確認した。

その結果、形質転換体と野生株は30℃でも生育できることが確認された。これ

に対してalg8変異株は30℃では生育できなかった。

【0024】

一方、30℃で生育できた形質転換体を採取し、完全培地で生育させた後、ガラスビーズで破碎した物を試料とし、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。同様にして、alg8株試料、及び上記W303-1A株（野生株）試料についても電気泳動を行った。これらの結果を合わせて図2に示す。

【0025】

図中1～4レーンは上記サッカロミセス・セレビジェ形質転換体から得られた試料についてのものであり、5レーンは別途培養して得られたalg8株試料であり、6レーンはW303-1A株（野生株）から得られた試料である。形質転換体試料とW303-1A株（野生株）試料においては、ともに完全に糖鎖が付加した分子量の大きなカルボキシペプチダーゼYに対応するバンドがみられるのに対して、alg8株試料では該バンドより分子量が小さく、糖鎖付加が起こっていないバンドしか見られない。

したがって、このことから、ヒト遺伝子MGC2840は出芽酵母内でも機能を相補することが明らかとなった。

【0026】

【実施例3】

〈ALG9ヒトホモログFLJ21845のクローニング〉

ヒトのcDNAライブラリーを用いてPCR法により遺伝子をクローニングした。cDNAライブラリーはCLONTECH社のQUICK-Clone cDNAを用いた。プライマーは、データベース上に登録されている配列をもとに、プライマーを作製した。それぞれのプライマーの配列を以下に示す。

AACGTTAACATGGCTAGTCGAGGGGCTCGGCAGCGCCTGAAGGGCAGC

AACGTTAACCTAACCTCCACTTTTCTTCCTGATTGCTTTGCTTTCCG

PCRの条件は以下の通りである。

94℃ 30秒

50℃ 30秒

72℃ 3分

30サイクル

【0027】

この条件で得られた約2kbpのDNA増幅断片をTAクローニングキットを用いてpCR2.1TOP0ベクターに挿入した。このクローニングした遺伝子をダイデオキシ法を用いたシーケンスキットにより塩基配列を確認した。該当遺伝子は配列番号5で示される塩基配列を有していた。なお、該遺伝子に対応する蛋白質のアミノ酸配列を配列番号6に示した。

〈形質転換〉

pCR2.1TOP0ベクターに挿入されているFLJ21845遺伝子をEcoR I-Dra Iで切り出し、酵母の解糖系のプロモーターGAPDHとそのターミネーターの間にpUC18のマルチクローニングサイトのうちEcoR IからSal Iまでの部分を持つ発現用ベクターYEp352GAPのEcoR I-Pvu IIサイトに挿入した。これらの発現ベクターを出芽酵母のサッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) alg9変異株へ形質転換した。

【0028】

〈alg9変異株の機能回復〉

得られた形質転換体について、N結合型糖鎖合成の有無の指標となる温度感受性を調べた。形質転換体及びコントロールであるサッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) W303-1A株 (野生株) とalg9変異株を以下の組成を有するSD-ura培地で30℃で5日間培養して、温度感受性を確認した。その結果、形質転換体と野生株は30℃でも生育できることが確認された。これに対してalg9変異株は30℃では生育できなかった。

【0029】

一方、30℃で生育できた形質転換体を採取し、完全培地で生育させた後、グラスビーズで破碎した物を試料とし、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。同様に、alg9株試料、及び上記W303-1A株 (野生株) 試料についても電気泳動を行った。これらの結果を合わせて図3に示す。

図中1～3レーンは上記サッカロミセス・セレビジェ形質転換体から得られた試料についてのものであり、4レーンは別途培養して得られたalg9株試料であり、5

レーンはW303-1A株（野生株）から得られた試料である。

【0030】

形質転換体試料とW303-1A株（野生株）試料においては、ともに完全に糖鎖が付加した分子量の大きなカルボキシペプチダーゼYに対応するバンドがみられるのに対して、alg9株試料では該バンドより分子量が小さく、糖鎖付加が起こっていないバンドしか見られない。

したがって、このことから、ヒト遺伝子FLJ21845は出芽酵母内でも機能を相補することが明らかとなった。

【0031】

【実施例4】

〈ALG10ヒトホモログXM_050190のクローニング〉

ヒトのcDNAを用いてPCR法により遺伝子をクローニングした。cDNAはヒトstomachのcDNAを用いた。プライマーは、データベース上に登録されている配列をもとに、プライマーを作製した。それぞれのプライマーの配列を以下に示す。

AAAAGGCCTATGGCGCAGCTGGAAGGTTACTATTTCTCGGCCGCCTTGTTTCCGGATTACCACATAAACCT
TTGA

ATGTCCTGACTATTTGGCCACT

PCRの条件は以下の通りである。

94℃ 30秒

50℃ 30秒

72℃ 2分

30サイクル

【0032】

この条件で得られた約1.5kbpのDNA増幅断片をTAクローニングキットを用いてpCR2.1TOPOベクターに挿入した。このクローニングした遺伝子をダイデオキシ法を用いたシーケンスキットにより塩基配列を確認した。該遺伝子は配列番号7で示される塩基配列を有していた。なお、該遺伝子に対応する蛋白質のアミノ酸配列を配列番号8に示した。

〈形質転換〉

pCR2.1TOP0ベクターに挿入されているXM_050190遺伝子をEcoR I-Kpn Iで切り出し、酵母の解糖系のプロモーターGAPDHとそのターミネーターの間にpUC18のマルチクローニングサイトのうちEcoR IからSal Iまでの部分を持つ発現用ベクターY Ep352GAPのEcoR I-Kpn Iサイトに挿入した。これらの発現ベクターを出芽酵母のサッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) alg10変異株へ形質転換した。

【0033】

〈alg10変異株の機能回復〉

得られた形質転換体について、N結合型糖鎖合成の有無の指標となる温度感受性を調べた。形質転換体及びコントロールであるサッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) W303-1A株 (野生株) とalg10変異株を以下の組成を有するSD-ura培地で30℃で5日間培養して、温度感受性を確認した。

その結果、形質転換体と野生株は30℃でも生育できることが確認された。これに対してalg10変異株は30℃では生育できなかった。

一方、30℃で生育できた形質転換体を採取し、完全培地で生育させた後、ガラスビーズで破碎した物を試料とし、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。同様にして、alg10株試料、及び上記W303-1A株 (野生株) 試料についても電気泳動を行った。これらの結果を合わせて図4に示す。

【0034】

図中1~4レーンは上記サッカロミセス・セレビジェ形質転換体から得られた試料についてのものであり、5レーンは別途培養して得られたalg10株試料であり、6レーンはW303-1A株 (野生株) から得られた試料である。

形質転換体試料とW303-1A株 (野生株) 試料においては、ともに完全に糖鎖が付加した分子量の大きなカルボキシペプチダーゼYに対応するバンドがみられるのに対して、alg10株試料では該バンドより分子量が小さく、糖鎖付加が起きていないバンドしか見られない。

したがって、このことから、ヒト遺伝子XM_050190は出芽酵母内でも機能を相補することが明らかとなった。

【0035】

【実施例5】**〈ALG12ヒトホモログMGC3136のクローニング〉**

ヒトのcDNAライブラリーを用いてPCR法により遺伝子をクローニングした。cDNAライブラリーはhuman tissueのcDNAを用いた。プライマーは、データベース上に登録されている配列をもとに、プライマーを作製した。それぞれのプライマーの配列を以下に示す。

CGGAATTCATGGCTGGAAAGGGGTCATCAGGCAGGCGG

CGGAATTCTCAGGACGGCCGGGGGAGCCTCTCCAGAAGC

PCRの条件は以下の通りである。

94℃ 30秒

50℃ 30秒

72℃ 3分

30サイクル

【0036】

この条件で得られた約1.5kbpのDNA増幅断片をTAクローニングキットを用いてpCR2.1TOPOベクターに挿入した。このクローニングした遺伝子をダイデオキシ法を用いたシークエンスキットにより塩基配列を確認した。該当遺伝子は配列番号9で示される塩基配列を有していた。なお、該遺伝子に対応する蛋白質のアミノ酸配列を配列番号10に示した。

〈形質転換〉

pCR2.1TOPOベクターに挿入されているMGC3136遺伝子をEcoR Iで切り出し、酵母の解糖系のプロモーターGAPDHとそのターミネーターの間にpUC18のマルチクローニングサイトのうちEcoR IからSal Iまでの部分を持つ発現用ベクターYEp352GAPのEcoR Iサイトに挿入した。これらの発現ベクターを出芽酵母のサッカロミセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) alg12変異株へ形質転換した。

【0037】**〈alg12変異株の機能回復〉**

形質転換体を採取し、完全培地で生育させた後、ガラスビーズで破碎した物を試料とし、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。同様にして、alg12株

試料、及び上記W303-1A株（野生株）試料についても電気泳動を行った。これらの結果を合わせて図5に示す。

図中1～4レーンは上記サッカロミセス・セレビジェ形質転換体から得られた試料についてのものであり、5レーンは別途培養して得られたalg12株試料であり、6レーンはW303-1A株（野生株）から得られた試料である。

形質転換体試料とW303-1A株（野生株）試料においては、ともに完全に糖鎖が付加した分子量の大きなカルボキシペプチダーゼYに対応するバンドがみられるのに対して、alg12株試料では該バンドより分子量が小さく、糖鎖付加が起っていないバンドしか見られない。

したがって、このことから、ヒト遺伝子MGC3136は出芽酵母内でも機能を相補することが明らかとなった。

【発明の効果】

本発明においては、ヒトの小胞体のN結合型糖鎖合成酵素の遺伝子を初めて明らかにした。ヒトの小胞体のN結合型糖鎖合成酵素の遺伝子Mの欠失あるいは変異は、糖タンパク質糖鎖不全症候群（CDGS）を引き起こすものとして知られているものであり、本発明の上記遺伝子は、糖タンパク質糖鎖不全症候群（CDGS）の診断及び治療等に極めて有用なものである。

【0038】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> N-glycan synthesis gene

<130> 332-02145

<140>

<141>

<150> JP 2002-60679

<151> 2002-03-06

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1479

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1479)

<400> 1

atg gcg gcc ggc gaa agg agc tgg tgc ctg tgc aag ttg ttg agg ttt 48

Met Ala Ala Gly Glu Arg Ser Trp Cys Leu Cys Lys Leu Leu Arg Phe

1 5 10 15

ttt tat tca tta ttc ttc cct ggg ctc att gta tgt gga act tta tgt 96

Phe Tyr Ser Leu Phe Phe Pro Gly Leu Ile Val Cys Gly Thr Leu Cys

20 25 30

gtg tgt ttg gtc att gtc ctt tgg gga atc aga ctg ctg cta cag aga 144

Val Cys Leu Val Ile Val Leu Trp Gly Ile Arg Leu Leu Leu Gln Arg
35 40 45

aag aaa aaa tta gtg tca act agc aaa aat ggg aaa aat caa atg gtg 192
Lys Lys Lys Leu Val Ser Thr Ser Lys Asn Gly Lys Asn Gln Met Val
50 55 60

att gca ttt ttt cat cca tac tgc aat gct ggt gga gga gga gaa aga 240
Ile Ala Phe Phe His Pro Tyr Cys Asn Ala Gly Gly Gly Gly Glu Arg
65 70 75 80

gtt tta tgg tgt gct tta aga gcc ctg cag aaa aag tat cct gaa gca 288
Val Leu Trp Cys Ala Leu Arg Ala Leu Gln Lys Lys Tyr Pro Glu Ala
85 90 95

gtt tat gtt gtt tat acc ggc gat gtt aat gtc aac ggt caa cag ata 336
Val Tyr Val Val Tyr Thr Gly Asp Val Asn Val Asn Gly Gln Gln Ile
100 105 110

cta gaa ggt gct ttc aga aga ttt aac atc aga tta att cac cca gtg 384
Leu Glu Gly Ala Phe Arg Arg Phe Asn Ile Arg Leu Ile His Pro Val
115 120 125

cag ttt gtt ttt tta agg aaa cgc tat ctt gtg gaa gat tca ctg tat 432
Gln Phe Val Phe Leu Arg Lys Arg Tyr Leu Val Glu Asp Ser Leu Tyr
130 135 140

cct cac ttc aca ctg ctg ggc caa agt cta gga tcc att ttt ctt ggc 480
Pro His Phe Thr Leu Leu Gly Gln Ser Leu Gly Ser Ile Phe Leu Gly

145	150	155	160
tgg gaa gct cta atg cag tgt gtt cct gat gtt tac att gat tca atg 528			
Trp Glu Ala Leu Met Gln Cys Val Pro Asp Val Tyr Ile Asp Ser Met			
165	170	175	
gga tac gct ttt acg ctt cct ctg ttt aag tat ata ggg ggt tgc caa 576			
Gly Tyr Ala Phe Thr Leu Pro Leu Phe Lys Tyr Ile Gly Gly Cys Gln			
180	185	190	
gtt gga agc tat gtt cat tat cct act atc agc acc gac atg ctc tct 624			
Val Gly Ser Tyr Val His Tyr Pro Thr Ile Ser Thr Asp Met Leu Ser			
195	200	205	
gta gtg aag aat caa aat att gga ttt aat aat gca gcc ttc att acc 672			
Val Val Lys Asn Gln Asn Ile Gly Phe Asn Asn Ala Ala Phe Ile Thr			
210	215	220	
agg aat cct ttt ctc agc aaa gta aag ctc atc tac tac tat tta ttt 720			
Arg Asn Pro Phe Leu Ser Lys Val Lys Leu Ile Tyr Tyr Tyr Leu Phe			
225	230	235	240
gct ttt att tat gga ctt gtt ggt tct tgc agt gat gta gtc atg gtc 768			
Ala Phe Ile Tyr Gly Leu Val Gly Ser Cys Ser Asp Val Val Met Val			
245	250	255	
aat tct tct tgg aca cta aac cat att ctc tca cta tgg aaa gtt ggg 816			
Asn Ser Ser Trp Thr Leu Asn His Ile Leu Ser Leu Trp Lys Val Gly			
260	265	270	

aat tgc act aac att gtt tat cca cct tgt gat gtg cag aca ttt ctg 864

Asn Cys Thr Asn Ile Val Tyr Pro Pro Cys Asp Val Gln Thr Phe Leu

275

280

285

gac att ccc tta cat gag aaa aag atg acc cca gga cat ttg ctg gtt 912

Asp Ile Pro Leu His Glu Lys Lys Met Thr Pro Gly His Leu Leu Val

290

295

300

tct gtt ggc cag ttt agg ccg gaa aag aat cat cca ttg cag atc aga 960

Ser Val Gly Gln Phe Arg Pro Glu Lys Asn His Pro Leu Gln Ile Arg

305

310

315

320

gcc ttt gct aaa ttg ctg aat aag aag atg gtt gag tca cct cct tcg 1008

Ala Phe Ala Lys Leu Leu Asn Lys Lys Met Val Glu Ser Pro Pro Ser

325

330

335

ctt aaa ctt gtc ctc att gga ggt tgt cgt aac aaa gat gat gaa ctt 1056

Leu Lys Leu Val Leu Ile Gly Gly Cys Arg Asn Lys Asp Asp Glu Leu

340

345

350

agg gta aac caa ctg aga agg ctg tct gag gat tta gga gtt caa gaa 1104

Arg Val Asn Gln Leu Arg Arg Leu Ser Glu Asp Leu Gly Val Gln Glu

355

360

365

tat gtg gaa ttt aaa ata aac att cca ttt gat gaa tta aag aat tat 1152

Tyr Val Glu Phe Lys Ile Asn Ile Pro Phe Asp Glu Leu Lys Asn Tyr

370

375

380

ttg tct gaa gca aca att ggt ctg cat acc atg tgg aac gag cat ttt 1200

Leu Ser Glu Ala Thr Ile Gly Leu His Thr Met Trp Asn Glu His Phe

385 390 395 400

ggg att gga gtt gtg gag tgt atg gca gct ggc aca att atc ctt gca 1248

Gly Ile Gly Val Val Glu Cys Met Ala Ala Gly Thr Ile Ile Leu Ala

405 410 415

cac aat tcg ggg ggc cca aag ctt gac att gtg gtt cct cac gaa gga 1296

His Asn Ser Gly Gly Pro Lys Leu Asp Ile Val Val Pro His Glu Gly

420 425 430

gat ata act ggc ttt ctg gct gag agt gaa gaa gac tat gct gaa act 1344

Asp Ile Thr Gly Phe Leu Ala Glu Ser Glu Glu Asp Tyr Ala Glu Thr

435 440 445

atc gct cac att ctt tcc atg tct gca gaa aag aga ctc caa atc aga 1392

Ile Ala His Ile Leu Ser Met Ser Ala Glu Lys Arg Leu Gln Ile Arg

450 455 460

aaa agt gct cgt gca tct gta agc aga ttc tct gat cag gaa ttt gaa 1440

Lys Ser Ala Arg Ala Ser Val Ser Arg Phe Ser Asp Gln Glu Phe Glu

465 470 475 480

gtg aca ttc cta tca tct gtg gaa aag tta ttt aag taa 1479

Val Thr Phe Leu Ser Ser Val Glu Lys Leu Phe Lys

485 490

<210> 2

<211> 492

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ala Gly Glu Arg Ser Trp Cys Leu Cys Lys Leu Leu Arg Phe

1

5

10

15

Phe Tyr Ser Leu Phe Phe Pro Gly Leu Ile Val Cys Gly Thr Leu Cys

20

25

30

Val Cys Leu Val Ile Val Leu Trp Gly Ile Arg Leu Leu Leu Gln Arg

35

40

45

Lys Lys Lys Leu Val Ser Thr Ser Lys Asn Gly Lys Asn Gln Met Val

50

55

60

Ile Ala Phe Phe His Pro Tyr Cys Asn Ala Gly Gly Gly Gly Glu Arg

65

70

75

80

Val Leu Trp Cys Ala Leu Arg Ala Leu Gln Lys Lys Tyr Pro Glu Ala

85

90

95

Val Tyr Val Val Tyr Thr Gly Asp Val Asn Val Asn Gly Gln Gln Ile

100

105

110

Leu Glu Gly Ala Phe Arg Arg Phe Asn Ile Arg Leu Ile His Pro Val

115

120

125

Gln Phe Val Phe Leu Arg Lys Arg Tyr Leu Val Glu Asp Ser Leu Tyr

130

135

140

Pro His Phe Thr Leu Leu Gly Gln Ser Leu Gly Ser Ile Phe Leu Gly

145

150

155

160

Trp Glu Ala Leu Met Gln Cys Val Pro Asp Val Tyr Ile Asp Ser Met

165

170

175

Gly Tyr Ala Phe Thr Leu Pro Leu Phe Lys Tyr Ile Gly Gly Cys Gln

180	185	190	
Val Gly Ser Tyr Val His Tyr Pro Thr Ile Ser Thr Asp Met Leu Ser			
195	200	205	
Val Val Lys Asn Gln Asn Ile Gly Phe Asn Asn Ala Ala Phe Ile Thr			
210	215	220	
Arg Asn Pro Phe Leu Ser Lys Val Lys Leu Ile Tyr Tyr Tyr Leu Phe			
225	230	235	240
Ala Phe Ile Tyr Gly Leu Val Gly Ser Cys Ser Asp Val Val Met Val			
245	250	255	
Asn Ser Ser Trp Thr Leu Asn His Ile Leu Ser Leu Trp Lys Val Gly			
260	265	270	
Asn Cys Thr Asn Ile Val Tyr Pro Pro Cys Asp Val Gln Thr Phe Leu			
275	280	285	
Asp Ile Pro Leu His Glu Lys Lys Met Thr Pro Gly His Leu Leu Val			
290	295	300	
Ser Val Gly Gln Phe Arg Pro Glu Lys Asn His Pro Leu Gln Ile Arg			
305	310	315	320
Ala Phe Ala Lys Leu Leu Asn Lys Lys Met Val Glu Ser Pro Pro Ser			
325	330	335	
Leu Lys Leu Val Leu Ile Gly Gly Cys Arg Asn Lys Asp Asp Glu Leu			
340	345	350	
Arg Val Asn Gln Leu Arg Arg Leu Ser Glu Asp Leu Gly Val Gln Glu			
355	360	365	
Tyr Val Glu Phe Lys Ile Asn Ile Pro Phe Asp Glu Leu Lys Asn Tyr			
370	375	380	
Leu Ser Glu Ala Thr Ile Gly Leu His Thr Met Trp Asn Glu His Phe			
385	390	395	400
Gly Ile Gly Val Val Glu Cys Met Ala Ala Gly Thr Ile Ile Leu Ala			
405	410	415	

His Asn Ser Gly Gly Pro Lys Leu Asp Ile Val Val Pro His Glu Gly
 420 425 430
 Asp Ile Thr Gly Phe Leu Ala Glu Ser Glu Glu Asp Tyr Ala Glu Thr
 435 440 445
 Ile Ala His Ile Leu Ser Met Ser Ala Glu Lys Arg Leu Gln Ile Arg
 450 455 460
 Lys Ser Ala Arg Ala Ser Val Ser Arg Phe Ser Asp Gln Glu Phe Glu
 465 470 475 480
 Val Thr Phe Leu Ser Ser Val Glu Lys Leu Phe Lys
 485 490

<210> 3

<211> 1581

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1581)

<400> 3

atg gcg gcg ctc aca att gcc acg ggt act ggc aat tgg ttt tcg gct 48
 Met Ala Ala Leu Thr Ile Ala Thr Gly Thr Gly Asn Trp Phe Ser Ala
 1 5 10 15

ttg gcg ctc ggg gtg act ctt ctc aaa tgc ctt ctc atc ccc aca tac 96
 Leu Ala Leu Gly Val Thr Leu Leu Lys Cys Leu Leu Ile Pro Thr Tyr

20

25

30

cat tcc aca gat ttt gaa gta cac cga aac tgg ctt gct atc act cac 144

His Ser Thr Asp Phe Glu Val His Arg Asn Trp Leu Ala Ile Thr His

35

40

45

agt ttg cca ata tca cag tgg tat tat gag gca act tca gag tgg acg 192

Ser Leu Pro Ile Ser Gln Trp Tyr Tyr Glu Ala Thr Ser Glu Trp Thr

50

55

60

ttg gat tac ccc cct ttc ttt gca tgg ttt gag tat atc ctg tca cat 240

Leu Asp Tyr Pro Pro Phe Phe Ala Trp Phe Glu Tyr Ile Leu Ser His

65

70

75

80

gtt gcc aaa tat ttt gat caa gaa atg ctg aat gtc cat aat ttg aat 288

Val Ala Lys Tyr Phe Asp Gln Glu Met Leu Asn Val His Asn Leu Asn

85

90

95

tac tcc agc tca agg acc tta ctt ttc cag aga ttt tcc gtc atc ttt 336

Tyr Ser Ser Ser Arg Thr Leu Leu Phe Gln Arg Phe Ser Val Ile Phe

100

105

110

atg gat gta ctc ttt gtg tat gct gtc cgt gag tgc tgt aaa tgc att 384

Met Asp Val Leu Phe Val Tyr Ala Val Arg Glu Cys Cys Lys Cys Ile

115

120

125

gat gga aaa aaa gtg ggt aaa gaa ctt aca gaa aag cca aaa ttt att 432

Asp Gly Lys Lys Val Gly Lys Glu Leu Thr Glu Lys Pro Lys Phe Ile

130

135

140

ctg tcg gta tta ctt ctg tgg aac ttc ggg tta tta att gtg gac cat 480
 Leu Ser Val Leu Leu Leu Trp Asn Phe Gly Leu Leu Ile Val Asp His
 145 150 155 160

att cat ttt cag tac aat ggc ttt tta ttt gga tta atg cta ctc tcc 528
 Ile His Phe Gln Tyr Asn Gly Phe Leu Phe Gly Leu Met Leu Leu Ser
 165 170 175

att gca cga tta ttt cag aaa agg cat atg gaa gga gca ttt ctc ttt 576
 Ile Ala Arg Leu Phe Gln Lys Arg His Met Glu Gly Ala Phe Leu Phe
 180 185 190

gct gtt ctc cta cat ttc aag cat atc tac ctc tat gta gca cca gct 624
 Ala Val Leu Leu His Phe Lys His Ile Tyr Leu Tyr Val Ala Pro Ala
 195 200 205

tat ggt gta tat ctg ctg cga tcc tac tgt ttc act gca aat aaa cca 672
 Tyr Gly Val Tyr Leu Leu Arg Ser Tyr Cys Phe Thr Ala Asn Lys Pro
 210 215 220

gat ggg tct att cga tgg aag agt ttc agc ttt gtt cgt gtt att tcc 720
 Asp Gly Ser Ile Arg Trp Lys Ser Phe Ser Phe Val Arg Val Ile Ser
 225 230 235 240

ctg gga ctg gtt gtt ttc tta gtt tct gct ctt tca ttg ggt cct ttc 768
 Leu Gly Leu Val Val Phe Leu Val Ser Ala Leu Ser Leu Gly Pro Phe
 245 250 255

ctg gcc ttg aat cag ctg cct caa gtc ttt tcc cga ctc ttt cct ttc 816

Leu Ala Leu Asn Gln Leu Pro Gln Val Phe Ser Arg Leu Phe Pro Phe

260

265

270

aag agg ggc ctc tgt cat gca tat tgg gct cca aac ttc tgg gct ttg 864

Lys Arg Gly Leu Cys His Ala Tyr Trp Ala Pro Asn Phe Trp Ala Leu

275

280

285

tac aat gct ttg gac aaa gtg ctg tct gtc atc ggt ttg aaa ttg aaa 912

Tyr Asn Ala Leu Asp Lys Val Leu Ser Val Ile Gly Leu Lys Leu Lys

290

295

300

ttt ctt gat ccc aac aat att ccc aag gcc tca atg aca agt ggt ttg 960

Phe Leu Asp Pro Asn Asn Ile Pro Lys Ala Ser Met Thr Ser Gly Leu

305

310

315

320

gtt cag cag ttc caa cac aca gtc ctt ccc tca gtg act ccc ttg gca 1008

Val Gln Gln Phe Gln His Thr Val Leu Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala

325

330

335

acc ctc atc tgc aca ctg att gcc ata ttg ccc tct att ttc tgt ctt 1056

Thr Leu Ile Cys Thr Leu Ile Ala Ile Leu Pro Ser Ile Phe Cys Leu

340

345

350

tgg ttt aaa ccc caa ggg ccc aga ggc ttt ctc cga tgt cta act ctt 1104

Trp Phe Lys Pro Gln Gly Pro Arg Gly Phe Leu Arg Cys Leu Thr Leu

355

360

365

tgt gcc ttg agc tcc ttt atg ttt ggg tgg cat gtt cat gaa aaa gcc 1152

Cys Ala Leu Ser Ser Phe Met Phe Gly Trp His Val His Glu Lys Ala

370

375

380

ata ctt cta gca att ctc cca atg agc ctt ttg tct gtg gga aaa gca 1200

Ile Leu Leu Ala Ile Leu Pro Met Ser Leu Leu Ser Val Gly Lys Ala

385

390

395

400

gga gac gct tcg att ttt ctg att ctg acc aca aca gga cat tat tcc 1248

Gly Asp Ala Ser Ile Phe Leu Ile Leu Thr Thr Thr Gly His Tyr Ser

405

410

415

ctc ttt cct ctg ctc ttc act gca cca gaa ctt ccc att aaa atc tta 1296

Leu Phe Pro Leu Leu Phe Thr Ala Pro Glu Leu Pro Ile Lys Ile Leu

420

425

430

ctc atg tta cta ttc acc ata tat agt att tcg tca ctg aag act tta 1344

Leu Met Leu Leu Phe Thr Ile Tyr Ser Ile Ser Ser Leu Lys Thr Leu

435

440

445

ttc aga aaa gaa aaa cct ctt ttt aat tgg atg gaa act ttc tac ctg 1392

Phe Arg Lys Glu Lys Pro Leu Phe Asn Trp Met Glu Thr Phe Tyr Leu

450

455

460

ctt ggc ctg ggg cct ctg gaa gtc tgc tgt gaa ttt gta ttc cct ttc 1440

Leu Gly Leu Gly Pro Leu Glu Val Cys Cys Glu Phe Val Phe Pro Phe

465

470

475

480

acc tcc tgg aag gtg aag tac ccc ttc atc cct ttg tta cta acc tca 1488

Thr Ser Trp Lys Val Lys Tyr Pro Phe Ile Pro Leu Leu Leu Thr Ser

485

490

495

gtg tat tgt gca gta ggc atc aca tat gct tgg ttc aaa ctg tat gtt 1536

Val Tyr Cys Ala Val Gly Ile Thr Tyr Ala Trp Phe Lys Leu Tyr Val

500

505

510

tca gta ttg att gac tct gct att ggc aag aca aag aaa caa tga 1581

Ser Val Leu Ile Asp Ser Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Gln

515

520

525

<210> 4

<211> 526

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Leu Thr Ile Ala Thr Gly Thr Gly Asn Trp Phe Ser Ala

1

5

10

15

Leu Ala Leu Gly Val Thr Leu Leu Lys Cys Leu Leu Ile Pro Thr Tyr

20

25

30

His Ser Thr Asp Phe Glu Val His Arg Asn Trp Leu Ala Ile Thr His

35

40

45

Ser Leu Pro Ile Ser Gln Trp Tyr Tyr Glu Ala Thr Ser Glu Trp Thr

50

55

60

Leu Asp Tyr Pro Pro Phe Phe Ala Trp Phe Glu Tyr Ile Leu Ser His

65

70

75

80

Val Ala Lys Tyr Phe Asp Gln Glu Met Leu Asn Val His Asn Leu Asn

85

90

95

Tyr Ser Ser Ser Arg Thr Leu Leu Phe Gln Arg Phe Ser Val Ile Phe
 100 105 110
 Met Asp Val Leu Phe Val Tyr Ala Val Arg Glu Cys Cys Lys Cys Ile
 115 120 125
 Asp Gly Lys Lys Val Gly Lys Glu Leu Thr Glu Lys Pro Lys Phe Ile
 130 135 140
 Leu Ser Val Leu Leu Leu Trp Asn Phe Gly Leu Leu Ile Val Asp His
 145 150 155 160
 Ile His Phe Gln Tyr Asn Gly Phe Leu Phe Gly Leu Met Leu Leu Ser
 165 170 175
 Ile Ala Arg Leu Phe Gln Lys Arg His Met Glu Gly Ala Phe Leu Phe
 180 185 190
 Ala Val Leu Leu His Phe Lys His Ile Tyr Leu Tyr Val Ala Pro Ala
 195 200 205
 Tyr Gly Val Tyr Leu Leu Arg Ser Tyr Cys Phe Thr Ala Asn Lys Pro
 210 215 220
 Asp Gly Ser Ile Arg Trp Lys Ser Phe Ser Phe Val Arg Val Ile Ser
 225 230 235 240
 Leu Gly Leu Val Val Phe Leu Val Ser Ala Leu Ser Leu Gly Pro Phe
 245 250 255
 Leu Ala Leu Asn Gln Leu Pro Gln Val Phe Ser Arg Leu Phe Pro Phe
 260 265 270
 Lys Arg Gly Leu Cys His Ala Tyr Trp Ala Pro Asn Phe Trp Ala Leu
 275 280 285
 Tyr Asn Ala Leu Asp Lys Val Leu Ser Val Ile Gly Leu Lys Leu Lys
 290 295 300
 Phe Leu Asp Pro Asn Asn Ile Pro Lys Ala Ser Met Thr Ser Gly Leu
 305 310 315 320
 Val Gln Gln Phe Gln His Thr Val Leu Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala

325 330 335
Thr Leu Ile Cys Thr Leu Ile Ala Ile Leu Pro Ser Ile Phe Cys Leu
340 345 350
Trp Phe Lys Pro Gln Gly Pro Arg Gly Phe Leu Arg Cys Leu Thr Leu
355 360 365
Cys Ala Leu Ser Ser Phe Met Phe Gly Trp His Val His Glu Lys Ala
370 375 380
Ile Leu Leu Ala Ile Leu Pro Met Ser Leu Leu Ser Val Gly Lys Ala
385 390 395 400
Gly Asp Ala Ser Ile Phe Leu Ile Leu Thr Thr Thr Gly His Tyr Ser
405 410 415
Leu Phe Pro Leu Leu Phe Thr Ala Pro Glu Leu Pro Ile Lys Ile Leu
420 425 430
Leu Met Leu Leu Phe Thr Ile Tyr Ser Ile Ser Ser Leu Lys Thr Leu
435 440 445
Phe Arg Lys Glu Lys Pro Leu Phe Asn Trp Met Glu Thr Phe Tyr Leu
450 455 460
Leu Gly Leu Gly Pro Leu Glu Val Cys Cys Glu Phe Val Phe Pro Phe
465 470 475 480
Thr Ser Trp Lys Val Lys Tyr Pro Phe Ile Pro Leu Leu Leu Thr Ser
485 490 495
Val Tyr Cys Ala Val Gly Ile Thr Tyr Ala Trp Phe Lys Leu Tyr Val
500 505 510
Ser Val Leu Ile Asp Ser Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Gln
515 520 525

<211> 1857

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1857)

<400> 5

atg gct agt cga ggg gct cgg cag cgc ctg aag ggc agc ggg gcc agc 48

Met Ala Ser Arg Gly Ala Arg Gln Arg Leu Lys Gly Ser Gly Ala Ser

1 5 10 15

agt ggg gat acg gcc ccg gct gcg gac aag ctg cgg gag ctg ctg ggc 96

Ser Gly Asp Thr Ala Pro Ala Ala Asp Lys Leu Arg Glu Leu Leu Gly

20 25 30

agc cga gag gcg ggc ggc gcg gag cac cgg acc gag tta tct ggg aac 144

Ser Arg Glu Ala Gly Gly Ala Glu His Arg Thr Glu Leu Ser Gly Asn

35 40 45

aaa gca gga caa gtc tgg gca cct gaa gga tct act gct ttc aag tgt 192

Lys Ala Gly Gln Val Trp Ala Pro Glu Gly Ser Thr Ala Phe Lys Cys

50 55 60

ctg ctt tca gca agg tta tgt gct gct ctc ctg agc aac atc tct gac 240

Leu Leu Ser Ala Arg Leu Cys Ala Ala Leu Leu Ser Asn Ile Ser Asp

65 70 75 80

tgt gat gaa aca ttc aac tac tgg gag cca aca cac tac ctc atc tat 288

Cys Asp Glu Thr Phe Asn Tyr Trp Glu Pro Thr His Tyr Leu Ile Tyr

85

90

95

ggg gaa ggg ttt cag act tgg gaa tat tcc cca gca tat gcc att cgc 336

Gly Glu Gly Phe Gln Thr Trp Glu Tyr Ser Pro Ala Tyr Ala Ile Arg

100

105

110

tcc tat gct tac ctg ttg ctt cat gcc tgg cca gct gca ttt cat gca 384

Ser Tyr Ala Tyr Leu Leu Leu His Ala Trp Pro Ala Ala Phe His Ala

115

120

125

aga att cta caa act aat aag att ctt gtg ttt tac ttt ttg cga tgt 432

Arg Ile Leu Gln Thr Asn Lys Ile Leu Val Phe Tyr Phe Leu Arg Cys

130

135

140

ctt ctg gct ttt gtg agc tgt att tgt gaa ctt tac ttt tac aag gct 480

Leu Leu Ala Phe Val Ser Cys Ile Cys Glu Leu Tyr Phe Tyr Lys Ala

145

150

155

160

gtg tgc aag aag ttt ggg ttg cac gtg agt cga atg atg cta gcc ttc 528

Val Cys Lys Lys Phe Gly Leu His Val Ser Arg Met Met Leu Ala Phe

165

170

175

ttg gtt ctc agc act ggc atg ttt tgc tca tca tca gca ttc ctt cct 576

Leu Val Leu Ser Thr Gly Met Phe Cys Ser Ser Ser Ala Phe Leu Pro

180

185

190

agt agc ttc tgt atg tac act acg ttg ata gcc atg act gga tgg tat 624

Ser Ser Phe Cys Met Tyr Thr Thr Leu Ile Ala Met Thr Gly Trp Tyr

195

200

205

atg gac aag act tcc att gct gtg ctg gga gta gca gct ggg gct atc 672

Met Asp Lys Thr Ser Ile Ala Val Leu Gly Val Ala Ala Gly Ala Ile

210

215

220

tta ggc tgg cca ttc agt gca gct ctt ggt tta ccc att gcc ttt gat 720

Leu Gly Trp Pro Phe Ser Ala Ala Leu Gly Leu Pro Ile Ala Phe Asp

225

230

235

240

ttg ctg gtc atg aaa cac agg tgg aag agt ttc ttt cat tgg tcg ctg 768

Leu Leu Val Met Lys His Arg Trp Lys Ser Phe Phe His Trp Ser Leu

245

250

255

atg gcc ctc ata cta ttt ctg gtg cct gtg gtg gtc att gac agc tac 816

Met Ala Leu Ile Leu Phe Leu Val Pro Val Val Val Ile Asp Ser Tyr

260

265

270

tat tat ggg aag ttg gtg att gca cca ctc aac att gtt ttg tat aat 864

Tyr Tyr Gly Lys Leu Val Ile Ala Pro Leu Asn Ile Val Leu Tyr Asn

275

280

285

atc ttt act cct cat gga cct gat ctt tat ggt aca gaa ccc tgg tat 912

Ile Phe Thr Pro His Gly Pro Asp Leu Tyr Gly Thr Glu Pro Trp Tyr

290

295

300

ttc tat tta att aat gga ttt ctg aat ttc aat gta gcc ttt gct ttg 960

Phe Tyr Leu Ile Asn Gly Phe Leu Asn Phe Asn Val Ala Phe Ala Leu

305	310	315	320
gct ctc cta gtc cta cca ctg act tct ctt atg gaa tac ctg ctg cag 1008			
Ala Leu Leu Val Leu Pro Leu Thr Ser Leu Met Glu Tyr Leu Leu Gln			
325	330	335	
aga ttt cat gtt cag aat tta ggc cac ccg tat tgg ctt acc ttg gct 1056			
Arg Phe His Val Gln Asn Leu Gly His Pro Tyr Trp Leu Thr Leu Ala			
340	345	350	
cca atg tat att tgg ttt ata att ttc ttc atc cag cct cac aaa gag 1104			
Pro Met Tyr Ile Trp Phe Ile Ile Phe Phe Ile Gln Pro His Lys Glu			
355	360	365	
gag aga ttt ctt ttc cct gtg tat cca ctt ata tgt ctc tgt ggt gct 1152			
Glu Arg Phe Leu Phe Pro Val Tyr Pro Leu Ile Cys Leu Cys Gly Ala			
370	375	380	
gtg gct ctc tct gca ctt cag cac agt ttt ctg tac ttc cag aaa tgt 1200			
Val Ala Leu Ser Ala Leu Gln His Ser Phe Leu Tyr Phe Gln Lys Cys			
385	390	395	400
tac cac ttt gtg ttt caa cga tat cgc ctg gag cac tat act gtg aca 1248			
Tyr His Phe Val Phe Gln Arg Tyr Arg Leu Glu His Tyr Thr Val Thr			
405	410	415	
tcg aat tgg ctg gca tta gga act gtc ttc ctg ttt ggg ctc ttg tca 1296			
Ser Asn Trp Leu Ala Leu Gly Thr Val Phe Leu Phe Gly Leu Leu Ser			
420	425	430	

ttt tct cgc tct gtg gca ctg ttc aga gga tat cac ggg ccc ctt gat 1344

Phe Ser Arg Ser Val Ala Leu Phe Arg Gly Tyr His Gly Pro Leu Asp

435

440

445

ttg tat cca gaa ttt tac cga att gct aca gac cca acc atc cac act 1392

Leu Tyr Pro Glu Phe Tyr Arg Ile Ala Thr Asp Pro Thr Ile His Thr

450

455

460

gtc cca gaa ggc aga cct gtg aat gtc tgt gtg gga aaa gag tgg tat 1440

Val Pro Glu Gly Arg Pro Val Asn Val Cys Val Gly Lys Glu Trp Tyr

465

470

475

480

cga ttt ccc agc agc ttc ctt ctt cct gac aat tgg cag ctt cag ttc 1488

Arg Phe Pro Ser Ser Phe Leu Leu Pro Asp Asn Trp Gln Leu Gln Phe

485

490

495

att cca tca gag ttc aga ggt cag tta cca aaa cct ttt gca gaa gga 1536

Ile Pro Ser Glu Phe Arg Gly Gln Leu Pro Lys Pro Phe Ala Glu Gly

500

505

510

cct ctg gcc acc cgg att gtt cct act gac atg aat gac cag aat cta 1584

Pro Leu Ala Thr Arg Ile Val Pro Thr Asp Met Asn Asp Gln Asn Leu

515

520

525

gaa gag cca tcc aga tat att gat atc agt aaa tgc cat tat tta gtg 1632

Glu Glu Pro Ser Arg Tyr Ile Asp Ile Ser Lys Cys His Tyr Leu Val

530

535

540

gat ttg gac acc atg aga gaa aca ccc cgg gag cca aaa tat tca tcc 1680
Asp Leu Asp Thr Met Arg Glu Thr Pro Arg Glu Pro Lys Tyr Ser Ser
545 550 555 560

aat aaa gaa gaa tgg atc agc ttg gcc tat aga cca ttc ctt gat gct 1728
Asn Lys Glu Glu Trp Ile Ser Leu Ala Tyr Arg Pro Phe Leu Asp Ala
565 570 575

tct aga tct tca aag ctg ctg cgg gca ttc tat gtc ccc ttc ctg tca 1776
Ser Arg Ser Ser Lys Leu Leu Arg Ala Phe Tyr Val Pro Phe Leu Ser
580 585 590

gat cag tat aca gtg tac gta aac tac acc atc ctc aaa ccc cgg aaa 1824
Asp Gln Tyr Thr Val Tyr Val Asn Tyr Thr Ile Leu Lys Pro Arg Lys
595 600 605

gca aag caa atc agg aag aaa agt gga ggt tag 1857
Ala Lys Gln Ile Arg Lys Lys Ser Gly Gly
610 615

<210> 6

<211> 618

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Ser Arg Gly Ala Arg Gln Arg Leu Lys Gly Ser Gly Ala Ser
1 5 10 15

Ser Gly Asp Thr Ala Pro Ala Ala Asp Lys Leu Arg Glu Leu Leu Gly
20 25 30
Ser Arg Glu Ala Gly Gly Ala Glu His Arg Thr Glu Leu Ser Gly Asn
35 40 45
Lys Ala Gly Gln Val Trp Ala Pro Glu Gly Ser Thr Ala Phe Lys Cys
50 55 60
Leu Leu Ser Ala Arg Leu Cys Ala Ala Leu Leu Ser Asn Ile Ser Asp
65 70 75 80
Cys Asp Glu Thr Phe Asn Tyr Trp Glu Pro Thr His Tyr Leu Ile Tyr
85 90 95
Gly Glu Gly Phe Gln Thr Trp Glu Tyr Ser Pro Ala Tyr Ala Ile Arg
100 105 110
Ser Tyr Ala Tyr Leu Leu Leu His Ala Trp Pro Ala Ala Phe His Ala
115 120 125
Arg Ile Leu Gln Thr Asn Lys Ile Leu Val Phe Tyr Phe Leu Arg Cys
130 135 140
Leu Leu Ala Phe Val Ser Cys Ile Cys Glu Leu Tyr Phe Tyr Lys Ala
145 150 155 160
Val Cys Lys Lys Phe Gly Leu His Val Ser Arg Met Met Leu Ala Phe
165 170 175
Leu Val Leu Ser Thr Gly Met Phe Cys Ser Ser Ser Ala Phe Leu Pro
180 185 190
Ser Ser Phe Cys Met Tyr Thr Thr Leu Ile Ala Met Thr Gly Trp Tyr
195 200 205
Met Asp Lys Thr Ser Ile Ala Val Leu Gly Val Ala Ala Gly Ala Ile
210 215 220
Leu Gly Trp Pro Phe Ser Ala Ala Leu Gly Leu Pro Ile Ala Phe Asp
225 230 235 240
Leu Leu Val Met Lys His Arg Trp Lys Ser Phe Phe His Trp Ser Leu

245	250	255
Met Ala Leu Ile Leu Phe Leu Val Pro Val Val Val Ile Asp Ser Tyr		
260	265	270
Tyr Tyr Gly Lys Leu Val Ile Ala Pro Leu Asn Ile Val Leu Tyr Asn		
275	280	285
Ile Phe Thr Pro His Gly Pro Asp Leu Tyr Gly Thr Glu Pro Trp Tyr		
290	295	300
Phe Tyr Leu Ile Asn Gly Phe Leu Asn Phe Asn Val Ala Phe Ala Leu		
305	310	315
Ala Leu Leu Val Leu Pro Leu Thr Ser Leu Met Glu Tyr Leu Leu Gln		
325	330	335
Arg Phe His Val Gln Asn Leu Gly His Pro Tyr Trp Leu Thr Leu Ala		
340	345	350
Pro Met Tyr Ile Trp Phe Ile Ile Phe Phe Ile Gln Pro His Lys Glu		
355	360	365
Glu Arg Phe Leu Phe Pro Val Tyr Pro Leu Ile Cys Leu Cys Gly Ala		
370	375	380
Val Ala Leu Ser Ala Leu Gln His Ser Phe Leu Tyr Phe Gln Lys Cys		
385	390	395
Tyr His Phe Val Phe Gln Arg Tyr Arg Leu Glu His Tyr Thr Val Thr		
405	410	415
Ser Asn Trp Leu Ala Leu Gly Thr Val Phe Leu Phe Gly Leu Leu Ser		
420	425	430
Phe Ser Arg Ser Val Ala Leu Phe Arg Gly Tyr His Gly Pro Leu Asp		
435	440	445
Leu Tyr Pro Glu Phe Tyr Arg Ile Ala Thr Asp Pro Thr Ile His Thr		
450	455	460
Val Pro Glu Gly Arg Pro Val Asn Val Cys Val Gly Lys Glu Trp Tyr		
465	470	475
		480

Arg Phe Pro Ser Ser Phe Leu Leu Pro Asp Asn Trp Gln Leu Gln Phe
485 490 495
Ile Pro Ser Glu Phe Arg Gly Gln Leu Pro Lys Pro Phe Ala Glu Gly
500 505 510
Pro Leu Ala Thr Arg Ile Val Pro Thr Asp Met Asn Asp Gln Asn Leu
515 520 525
Glu Glu Pro Ser Arg Tyr Ile Asp Ile Ser Lys Cys His Tyr Leu Val
530 535 540
Asp Leu Asp Thr Met Arg Glu Thr Pro Arg Glu Pro Lys Tyr Ser Ser
545 550 555 560
Asn Lys Glu Glu Trp Ile Ser Leu Ala Tyr Arg Pro Phe Leu Asp Ala
565 570 575
Ser Arg Ser Ser Lys Leu Leu Arg Ala Phe Tyr Val Pro Phe Leu Ser
580 585 590
Asp Gln Tyr Thr Val Tyr Val Asn Tyr Thr Ile Leu Lys Pro Arg Lys
595 600 605
Ala Lys Gln Ile Arg Lys Lys Ser Gly Gly
610 615

<210> 7

<211> 1422

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1422)

<400> 7

atg gcg cag ctg gaa ggt tac tat ttc tcg gcc gcc ttg agc tgt acc 48

Met Ala Gln Leu Glu Gly Tyr Tyr Phe Ser Ala Ala Leu Ser Cys Thr

1

5

10

15

ttt tta gta tcc tgc ctc ctc ttc tcc gcc ttc agc cgg gcg ttg cga 96

Phe Leu Val Ser Cys Leu Leu Phe Ser Ala Phe Ser Arg Ala Leu Arg

20

25

30

gag ccc tac atg gac gag atc ttc cac ctg cct cag gcg cag cgc tac 144

Glu Pro Tyr Met Asp Glu Ile Phe His Leu Pro Gln Ala Gln Arg Tyr

35

40

45

tgt gag ggc cat ttc tcc ctt tcc cag tgg gat ccc atg att act aca 192

Cys Glu Gly His Phe Ser Leu Ser Gln Trp Asp Pro Met Ile Thr Thr

50

55

60

tta cct ggc ttg tac ctg gtg tca att gga gtg atc aaa cct gcc att 240

Leu Pro Gly Leu Tyr Leu Val Ser Ile Gly Val Ile Lys Pro Ala Ile

65

70

75

80

tgg atc ttt gga tgg tct gaa cat gtt gtc tgc tcc att ggg atg ctc 288

Trp Ile Phe Gly Trp Ser Glu His Val Val Cys Ser Ile Gly Met Leu

85

90

95

aga ttt gtt aat ctt ctc ttc agt gtt ggc aac ttc tat tta cta tat 336

Arg Phe Val Asn Leu Leu Phe Ser Val Gly Asn Phe Tyr Leu Leu Tyr

100

105

110

ttg ctt ttc tgc aag gta caa ccc aga aac aag gct gcc tca agt atc 384

Leu Leu Phe Cys Lys Val Gln Pro Arg Asn Lys Ala Ala Ser Ser Ile

115

120

125

cag aga gtc ttg tca aca tta aca cta gca gta ttt cca aca ctt tat 432

Gln Arg Val Leu Ser Thr Leu Thr Leu Ala Val Phe Pro Thr Leu Tyr

130

135

140

ttt ttt aac ttc ctt tat tat aca gaa gca gga tct atg ttt ttt act 480

Phe Phe Asn Phe Leu Tyr Tyr Thr Glu Ala Gly Ser Met Phe Phe Thr

145

150

155

160

ctt ttt gcg tat ttg atg tgt ctt tat gga aat cat aaa act tca gcc 528

Leu Phe Ala Tyr Leu Met Cys Leu Tyr Gly Asn His Lys Thr Ser Ala

165

170

175

ttc ctt gga ttt tgt ggc ttc atg ttt cgg caa aca aat atc atc tgg 576

Phe Leu Gly Phe Cys Gly Phe Met Phe Arg Gln Thr Asn Ile Ile Trp

180

185

190

gct gtc ttc tgt gca gga aat gtc att gca caa aag tta acg gag gct 624

Ala Val Phe Cys Ala Gly Asn Val Ile Ala Gln Lys Leu Thr Glu Ala

195

200

205

tgg aaa act gag cta caa aag aag gaa gac aga ctt cca cct att aaa 672

Trp Lys Thr Glu Leu Gln Lys Lys Glu Asp Arg Leu Pro Pro Ile Lys

210

215

220

gga cca ttt gca gaa ttc aga aaa att ctt cag ttt ctt ttg gct tat 720
 Gly Pro Phe Ala Glu Phe Arg Lys Ile Leu Gln Phe Leu Leu Ala Tyr
 225 230 235 240

tcc atg tcc ttt aaa aac ttg agt atg ctt ttg ctt ctg act tgg ccc 768
 Ser Met Ser Phe Lys Asn Leu Ser Met Leu Leu Leu Leu Thr Trp Pro
 245 250 255

tac atc ctt ctg gga ttt ctg ttt tgt gct ttt gta gta gtt aat ggt 816
 Tyr Ile Leu Leu Gly Phe Leu Phe Cys Ala Phe Val Val Val Asn Gly
 260 265 270

gga att gtt att ggc gat cgg agt agt cat gaa gcc tgt ctt cat ttt 864
 Gly Ile Val Ile Gly Asp Arg Ser Ser His Glu Ala Cys Leu His Phe
 275 280 285

cct caa cta ttc tac ttt ttt tca ttt act ctc ttt ttt tcc ttt cct 912
 Pro Gln Leu Phe Tyr Phe Phe Ser Phe Thr Leu Phe Phe Ser Phe Pro
 290 295 300

cat ctc ctg tct cct agc aaa att aag act ttt ctt tcc tta gtt tgg 960
 His Leu Leu Ser Pro Ser Lys Ile Lys Thr Phe Leu Ser Leu Val Trp
 305 310 315 320

aaa cgt aga att ctg ttt ttt gtg gtt acc tta gtc tct gtg ttt tta 1008
 Lys Arg Arg Ile Leu Phe Phe Val Val Thr Leu Val Ser Val Phe Leu
 325 330 335

gtt tgg aaa ttc act tat gct cat aaa tac ttg cta gca gac aat aga 1056

Val Trp Lys Phe Thr Tyr Ala His Lys Tyr Leu Leu Ala Asp Asn Arg

340

345

350

cat tat act ttc tat gtg tgg aaa aga gtt ttt caa aga tat gaa act 1104

His Tyr Thr Phe Tyr Val Trp Lys Arg Val Phe Gln Arg Tyr Glu Thr

355

360

365

gta aaa tat ttg tta gtt cca gcc tat ata ttt gct ggt tgg agt ata 1152

Val Lys Tyr Leu Leu Val Pro Ala Tyr Ile Phe Ala Gly Trp Ser Ile

370

375

380

gct gac tca ttg aaa tca aag tca att ttt tgg aat tta atg ttt ttc 1200

Ala Asp Ser Leu Lys Ser Lys Ser Ile Phe Trp Asn Leu Met Phe Phe

385

390

395

400

ata tgc ttg ttc act gtt ata gtt cct cag aaa ctg ctg gaa ttt cgt 1248

Ile Cys Leu Phe Thr Val Ile Val Pro Gln Lys Leu Leu Glu Phe Arg

405

410

415

tac ttc att tta cct tat gtc att tat agg ctt aac ata cct ctg cct 1296

Tyr Phe Ile Leu Pro Tyr Val Ile Tyr Arg Leu Asn Ile Pro Leu Pro

420

425

430

ccc aca tcc aga ctc att tgt gaa ctg agc tgc tat gca gtt gtt aat 1344

Pro Thr Ser Arg Leu Ile Cys Glu Leu Ser Cys Tyr Ala Val Val Asn

435

440

445

ttc ata act ttt ttc atc ttt ctg aac aag act ttt cag tgg cca aat 1392

Phe Ile Thr Phe Phe Ile Phe Leu Asn Lys Thr Phe Gln Trp Pro Asn

450

455

460

agt cag gac att caa agg ttt atg tgg taa

1422

Ser Gln Asp Ile Gln Arg Phe Met Trp

465

470

<210> 8

<211> 473

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ala Gln Leu Glu Gly Tyr Tyr Phe Ser Ala Ala Leu Ser Cys Thr

1

5

10

15

Phe Leu Val Ser Cys Leu Leu Phe Ser Ala Phe Ser Arg Ala Leu Arg

20

25

30

Glu Pro Tyr Met Asp Glu Ile Phe His Leu Pro Gln Ala Gln Arg Tyr

35

40

45

Cys Glu Gly His Phe Ser Leu Ser Gln Trp Asp Pro Met Ile Thr Thr

50

55

60

Leu Pro Gly Leu Tyr Leu Val Ser Ile Gly Val Ile Lys Pro Ala Ile

65

70

75

80

Trp Ile Phe Gly Trp Ser Glu His Val Val Cys Ser Ile Gly Met Leu

85

90

95

Arg Phe Val Asn Leu Leu Phe Ser Val Gly Asn Phe Tyr Leu Leu Tyr

100

105

110

Leu Leu Phe Cys Lys Val Gln Pro Arg Asn Lys Ala Ala Ser Ser Ile

115

120

125

Gln Arg Val Leu Ser Thr Leu Thr Leu Ala Val Phe Pro Thr Leu Tyr

130

135

140

Phe Phe Asn Phe Leu Tyr Tyr Thr Glu Ala Gly Ser Met Phe Phe Thr

145

150

155

160

Leu Phe Ala Tyr Leu Met Cys Leu Tyr Gly Asn His Lys Thr Ser Ala

165

170

175

Phe Leu Gly Phe Cys Gly Phe Met Phe Arg Gln Thr Asn Ile Ile Trp

180

185

190

Ala Val Phe Cys Ala Gly Asn Val Ile Ala Gln Lys Leu Thr Glu Ala

195

200

205

Trp Lys Thr Glu Leu Gln Lys Lys Glu Asp Arg Leu Pro Pro Ile Lys

210

215

220

Gly Pro Phe Ala Glu Phe Arg Lys Ile Leu Gln Phe Leu Leu Ala Tyr

225

230

235

240

Ser Met Ser Phe Lys Asn Leu Ser Met Leu Leu Leu Leu Thr Trp Pro

245

250

255

Tyr Ile Leu Leu Gly Phe Leu Phe Cys Ala Phe Val Val Val Asn Gly

260

265

270

Gly Ile Val Ile Gly Asp Arg Ser Ser His Glu Ala Cys Leu His Phe

275

280

285

Pro Gln Leu Phe Tyr Phe Phe Ser Phe Thr Leu Phe Phe Ser Phe Pro

290

295

300

His Leu Leu Ser Pro Ser Lys Ile Lys Thr Phe Leu Ser Leu Val Trp

305

310

315

320

Lys Arg Arg Ile Leu Phe Phe Val Val Thr Leu Val Ser Val Phe Leu

325

330

335

Val Trp Lys Phe Thr Tyr Ala His Lys Tyr Leu Leu Ala Asp Asn Arg

340

345

350

His Tyr Thr Phe Tyr Val Trp Lys Arg Val Phe Gln Arg Tyr Glu Thr

355	360	365
Val Lys Tyr Leu Leu Val Pro Ala Tyr Ile Phe Ala Gly Trp Ser Ile		
370	375	380
Ala Asp Ser Leu Lys Ser Lys Ser Ile Phe Trp Asn Leu Met Phe Phe		
385	390	395
Ile Cys Leu Phe Thr Val Ile Val Pro Gln Lys Leu Leu Glu Phe Arg		
405	410	415
Tyr Phe Ile Leu Pro Tyr Val Ile Tyr Arg Leu Asn Ile Pro Leu Pro		
420	425	430
Pro Thr Ser Arg Leu Ile Cys Glu Leu Ser Cys Tyr Ala Val Val Asn		
435	440	445
Phe Ile Thr Phe Phe Ile Phe Leu Asn Lys Thr Phe Gln Trp Pro Asn		
450	455	460
Ser Gln Asp Ile Gln Arg Phe Met Trp		
465	470	

<210> 9

<211> 1467

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1467)

<400> 9

atg gct gga aag ggg tca tca ggc agg cgg ccc ctg ctg ctg ggg ctg 48

Met Ala Gly Lys Gly Ser Ser Gly Arg Arg Pro Leu Leu Leu Gly Leu

1

5

10

15

ctg gtg gcc gta gcc act gtc cac ctg gtc atc tgt ccc tac acc aaa 96

Leu Val Ala Val Ala Thr Val His Leu Val Ile Cys Pro Tyr Thr Lys

20

25

30

gtg gag gag agc ttc aac ctg cag gcc aca cat gac ctg ctc tac cac 144

Val Glu Glu Ser Phe Asn Leu Gln Ala Thr His Asp Leu Leu Tyr His

35

40

45

tgg caa gac ctg gag cag tac gac cat ctt gag ttc ccc gga gtc gtc 192

Trp Gln Asp Leu Glu Gln Tyr Asp His Leu Glu Phe Pro Gly Val Val

50

55

60

ccc agg acg ttc ctc ggg cca gtg gtg atc gca gtg ttc tcc agc ccc 240

Pro Arg Thr Phe Leu Gly Pro Val Val Ile Ala Val Phe Ser Ser Pro

65

70

75

80

gcg gtt tac gtg ctt tcg ctg tta gaa atg tcc aag ttt tac tct cag 288

Ala Val Tyr Val Leu Ser Leu Leu Glu Met Ser Lys Phe Tyr Ser Gln

85

90

95

cta ata gtt aga gga gtg ctt gga ctc ggc gtg att ttt gga ctc tgg 336

Leu Ile Val Arg Gly Val Leu Gly Leu Gly Val Ile Phe Gly Leu Trp

100

105

110

acg tta caa aag gaa gtg aga cgg cac ttc ggg gcc atg gtg gcc acc 384

Thr Leu Gln Lys Glu Val Arg Arg His Phe Gly Ala Met Val Ala Thr

115	120	125	
atg ttc tgc tgg gtg acg gcc atg cag ttc cac ctg atg ttc tac tgc 432			
Met Phe Cys Trp Val Thr Ala Met Gln Phe His Leu Met Phe Tyr Cys			
130	135	140	
acg cgg aca ctg ccc aat gtg ctg gcc ctg cct gta gtc ctg ctg gcc 480			
Thr Arg Thr Leu Pro Asn Val Leu Ala Leu Pro Val Val Leu Leu Ala			
145	150	155	160
ctc gcg gcc tgg ctg cgg cac gag tgg gcc cgc ttc atc tgg ctg tca 528			
Leu Ala Ala Trp Leu Arg His Glu Trp Ala Arg Phe Ile Trp Leu Ser			
165	170	175	
gcc ttc gcc atc atc gtg ttc agg gtg gag ctg tgc ctg ttc ctg ggc 576			
Ala Phe Ala Ile Ile Val Phe Arg Val Glu Leu Cys Leu Phe Leu Gly			
180	185	190	
ctc ctg ctg ctg ctg gcc ttg ggc aac cga aag gtt tct gta gtc aga 624			
Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Asn Arg Lys Val Ser Val Val Arg			
195	200	205	
gcc ctt cgc cac gcc gtc ccg gca ggg atc ctc tgt tta gga ctg acg 672			
Ala Leu Arg His Ala Val Pro Ala Gly Ile Leu Cys Leu Gly Leu Thr			
210	215	220	
gtt gct gtg gac tct tat ttt tgg cgg cag ctc act tgg ccg gaa gga 720			
Val Ala Val Asp Ser Tyr Phe Trp Arg Gln Leu Thr Trp Pro Glu Gly			
225	230	235	240

aag gtg ctt tgg tac aac act gtc ctg aac aaa agc tcc aac tgg ggg 768

Lys Val Leu Trp Tyr Asn Thr Val Leu Asn Lys Ser Ser Asn Trp Gly

245

250

255

acc tcc ccg ctg ctg tgg tac ttc tac tca gcc ctg ccc cgc ggc ctg 816

Thr Ser Pro Leu Leu Trp Tyr Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Arg Gly Leu

260

265

270

ggc tgc agc ctg ctc ttc atc ccc ctg ggc ttg gta gac aga agg acg 864

Gly Cys Ser Leu Leu Phe Ile Pro Leu Gly Leu Val Asp Arg Arg Thr

275

280

285

cac gcg ccg acg gtg ctg gca ctg ggc ttc atg gca ctc tac tcc ctc 912

His Ala Pro Thr Val Leu Ala Leu Gly Phe Met Ala Leu Tyr Ser Leu

290

295

300

ctg cca cac aag gag cta cgc ttc atc atc tat gcc ttc ccc atg ctc 960

Leu Pro His Lys Glu Leu Arg Phe Ile Ile Tyr Ala Phe Pro Met Leu

305

310

315

320

aac atc acg gct gcc aga ggc tgc tcc tac ctg ctg aat aac tat aaa 1008

Asn Ile Thr Ala Ala Arg Gly Cys Ser Tyr Leu Leu Asn Asn Tyr Lys

325

330

335

aag tct tgg ctg tac aaa gcg ggg tct ctg ctt gtg atc gga cac ctc 1056

Lys Ser Trp Leu Tyr Lys Ala Gly Ser Leu Leu Val Ile Gly His Leu

340

345

350

gtg gtg aat gcc gcc tac tca gcc acg gcc ctg tat gtg tcc cat ttc 1104

Val Val Asn Ala Ala Tyr Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Val Ser His Phe

355

360

365

aac tac cca ggt ggc gtc gca atg cag agg ctg cac cag ctg gtg ccc 1152

Asn Tyr Pro Gly Gly Val Ala Met Gln Arg Leu His Gln Leu Val Pro

370

375

380

ccc cag aca gac gtc ctt ctg cac att gac gtg gca gcc gcc cag aca 1200

Pro Gln Thr Asp Val Leu Leu His Ile Asp Val Ala Ala Ala Gln Thr

385

390

395

400

ggt gtg tct cgg ttt ctc caa gtc aac agc gcc tgg agg tac gac aag 1248

Gly Val Ser Arg Phe Leu Gln Val Asn Ser Ala Trp Arg Tyr Asp Lys

405

410

415

agg gag gat gtg cag ccg ggg aca ggc atg ctg gca tac aca cac atc 1296

Arg Glu Asp Val Gln Pro Gly Thr Gly Met Leu Ala Tyr Thr His Ile

420

425

430

ctc atg gag gcg gcc cct ggg ctc ctg gcc ctc tac agg gac aca cac 1344

Leu Met Glu Ala Ala Pro Gly Leu Leu Ala Leu Tyr Arg Asp Thr His

435

440

445

cgg gtc ctg gcc agc gtc gtg ggg acc aca ggt gtg agt ctg aac ctg 1392

Arg Val Leu Ala Ser Val Val Gly Thr Thr Gly Val Ser Leu Asn Leu

450

455

460

acc caa ctg ccc ccc ttc aac gtc cac ctg cag aca aag ctg gtg ctt 1440

Thr Gln Leu Pro Pro Phe Asn Val His Leu Gln Thr Lys Leu Val Leu

465 470 475 480

ctg gag agg ctc ccc cgg ccg tcc tga

1467

Leu Glu Arg Leu Pro Arg Pro Ser

485

<210> 10

<211> 488

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ala Gly Lys Gly Ser Ser Gly Arg Arg Pro Leu Leu Leu Gly Leu

1 5 10 15

Leu Val Ala Val Ala Thr Val His Leu Val Ile Cys Pro Tyr Thr Lys

20 25 30

Val Glu Glu Ser Phe Asn Leu Gln Ala Thr His Asp Leu Leu Tyr His

35 40 45

Trp Gln Asp Leu Glu Gln Tyr Asp His Leu Glu Phe Pro Gly Val Val

50 55 60

Pro Arg Thr Phe Leu Gly Pro Val Val Ile Ala Val Phe Ser Ser Pro

65 70 75 80

Ala Val Tyr Val Leu Ser Leu Leu Glu Met Ser Lys Phe Tyr Ser Gln

85 90 95

Leu Ile Val Arg Gly Val Leu Gly Leu Gly Val Ile Phe Gly Leu Trp

100 105 110

Thr Leu Gln Lys Glu Val Arg Arg His Phe Gly Ala Met Val Ala Thr

115	120	125	
Met Phe Cys Trp Val Thr Ala Met Gln Phe His Leu Met Phe Tyr Cys			
130	135	140	
Thr Arg Thr Leu Pro Asn Val Leu Ala Leu Pro Val Val Leu Leu Ala			
145	150	155	160
Leu Ala Ala Trp Leu Arg His Glu Trp Ala Arg Phe Ile Trp Leu Ser			
165	170	175	
Ala Phe Ala Ile Ile Val Phe Arg Val Glu Leu Cys Leu Phe Leu Gly			
180	185	190	
Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Asn Arg Lys Val Ser Val Val Arg			
195	200	205	
Ala Leu Arg His Ala Val Pro Ala Gly Ile Leu Cys Leu Gly Leu Thr			
210	215	220	
Val Ala Val Asp Ser Tyr Phe Trp Arg Gln Leu Thr Trp Pro Glu Gly			
225	230	235	240
Lys Val Leu Trp Tyr Asn Thr Val Leu Asn Lys Ser Ser Asn Trp Gly			
245	250	255	
Thr Ser Pro Leu Leu Trp Tyr Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Arg Gly Leu			
260	265	270	
Gly Cys Ser Leu Leu Phe Ile Pro Leu Gly Leu Val Asp Arg Arg Thr			
275	280	285	
His Ala Pro Thr Val Leu Ala Leu Gly Phe Met Ala Leu Tyr Ser Leu			
290	295	300	
Leu Pro His Lys Glu Leu Arg Phe Ile Ile Tyr Ala Phe Pro Met Leu			
305	310	315	320
Asn Ile Thr Ala Ala Arg Gly Cys Ser Tyr Leu Leu Asn Asn Tyr Lys			
325	330	335	
Lys Ser Trp Leu Tyr Lys Ala Gly Ser Leu Leu Val Ile Gly His Leu			
340	345	350	

Val Val Asn Ala Ala Tyr Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Val Ser His Phe
355 360 365
Asn Tyr Pro Gly Gly Val Ala Met Gln Arg Leu His Gln Leu Val Pro
370 375 380
Pro Gln Thr Asp Val Leu Leu His Ile Asp Val Ala Ala Ala Gln Thr
385 390 395 400
Gly Val Ser Arg Phe Leu Gln Val Asn Ser Ala Trp Arg Tyr Asp Lys
405 410 415
Arg Glu Asp Val Gln Pro Gly Thr Gly Met Leu Ala Tyr Thr His Ile
420 425 430
Leu Met Glu Ala Ala Pro Gly Leu Leu Ala Leu Tyr Arg Asp Thr His
435 440 445
Arg Val Leu Ala Ser Val Val Gly Thr Thr Gly Val Ser Leu Asn Leu
450 455 460
Thr Gln Leu Pro Pro Phe Asn Val His Leu Gln Thr Lys Leu Val Leu
465 470 475 480
Leu Glu Arg Leu Pro Arg Pro Ser
485

【図面の簡単な説明】

【図 1】形質転換体試料、JY746株（野生株）試料およびgmd3株試料について行った電気泳動の結果を示す図である。

【図 2】形質転換体試料、W303-1A株（野生株）試料およびalg8株試料について行った電気泳動の結果を示す図である。

【図 3】形質転換体試料、W303-1A株（野生株）試料およびalg9株試料について行った電気泳動の結果を示す図である。

【図4】形質転換体試料、W303-1A株（野生株）試料およびalg10株試料について行った電気泳動の結果を示す図である。

【図5】形質転換体試料、W303-1A株（野生株）試料およびalg12株試料について行った電気泳動の結果を示す図である。

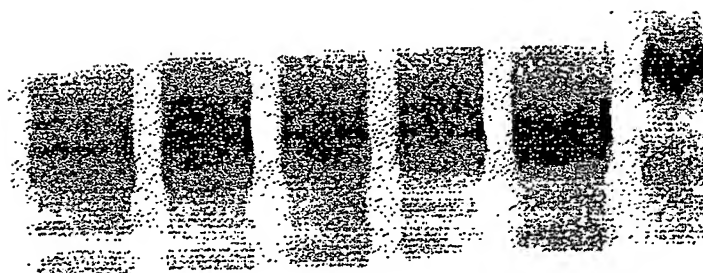
【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】

1 2 3 4 5 6



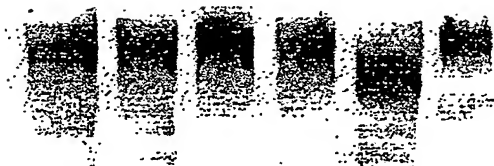
【図 3】

1 2 3 4 5

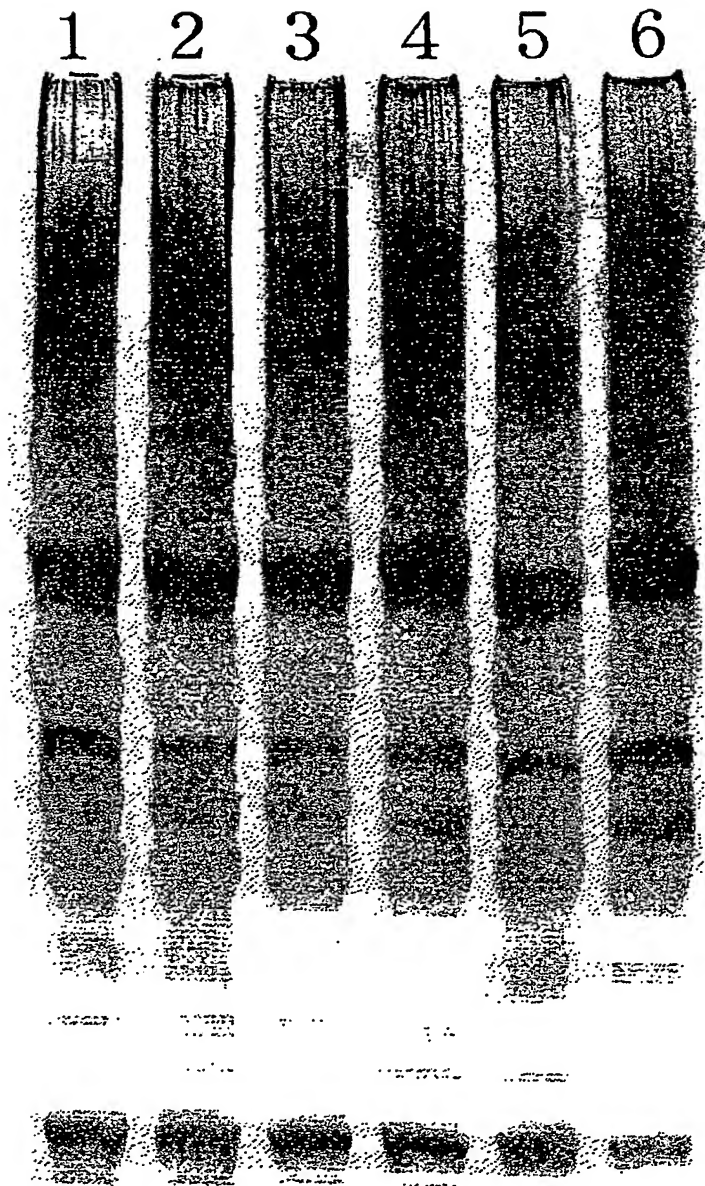


【図4】

M 1 2 3 4 5 6



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒトの小胞体のN結合型糖鎖合成酵素の遺伝子を明らかにすることにより、糖タンパク質糖鎖不全症候群（CDGS）の診断あるいは治療に有効な手段を提供する。

【課題解決手段】

酵母小胞体におけるN結合型糖鎖合成を触媒する酵素遺伝子と相同性を有し、かつ酵母における該遺伝子の欠失株に対して該遺伝子の機能を相補し得ることを指標として、ヒトN結合型糖鎖合成を触媒する酵素の遺伝子を見いだす。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-230196
受付番号	50201174395
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成14年 8月12日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 8月 7日

次頁無

特願 2002-230196

出願人履歴情報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.